

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

大鼠複合組織異體移植後細胞交移現象之研究

Study of cells microchimerism after rat osteomyocutaneous
allograft transplantation

計畫編號：NSC89-2320-B-002-074

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：侯勝茂 國立台灣大學醫學院骨科

共同主持人：葉力森 國立台灣大學獸醫系

協同研究人員：林凱信 國立台灣大學醫學院 小兒科

協同研究人員：林中天 國立台灣大學獸醫系

† 八十六年度及以前的一般國科會專題計畫(不含產學合作研究計畫)亦可選擇適用，惟較特殊的計畫如國科會規劃案等，請先洽得國科會各學術處同意。

一、中文摘要

肢體移植因為牽涉的組織相當多，故在以往的移植研究中，即使伴隨使用免疫抑制劑也無法有效控制移植後所產生的排斥反應；本研究室在先前對帶骨骼、肌肉及皮膚組織的移植(OMC Tx)研究中，老鼠在併用 30 天的短期給予 Leflunomide (10mg/kg/day)與 FK506 (0.5mg/kg/day)後，能使移植的複合組織在停藥後仍能存活，沒有出現任何排斥現象及副作用，因此本實驗擬利用流式細胞計數儀的技術，研究 OMC Tx 在不同處理情形下，週邊血液細胞交移的情形。實驗處理分三組，第一組是在 OMC Tx 前一天至後 30 天口服投予 LEF 10 mg/kg 及皮下注射 FK506 0.5 mg/kg；第二組是在移植前 7 天給予一次 1ml 的 donor specific transfusion (DST)，其他免疫抑制劑給予與第一組相同；第三組處理與第一組相同，只是 FK506 的劑量由 0.5mg 提高至 1mg。結果移植物的排斥時間依序為 63.17 ± 23.86 天， 41.6 ± 0.9 天及 73 ± 13.08 天；移植期間，經 DST 後週邊血液細胞交移的情形與其他兩組相較明顯偏低，發生排斥的時間較早，因此週邊血液細胞交移應與移植存活有一定相關；移植後，血液中 CD4+ 及 CD8+ 細胞的比率無太大變動，但 donor 來源的 CD4+ 細胞比率逐漸攀升限向，這可能與移植最後發生排斥有關；另外由 CD45RC 分子表現的情形來看，本實驗所採用的免疫抑制計畫確實能控制複合組織的急性排斥反應。

關鍵詞：帶皮膚、肌肉、骨骼及血管的異體移植，免疫抑制劑，流式細胞計數儀，CD4、CD8、CD45RC 及細胞交移

Abstract

Limb allotransplantation has been very challenging in contrast to solid organ transplantation, partly because the variety of tissues (composite tissues) involved. In immunology, many tissues in limbs are extremely antigenic, which make limb allotransplantation remaining in the status of animal experimentation. Our present studies developed a successful osteomyocutaneous allotransplant model, and by using the combination of leflunomide and FK506 for 30 days, grafts survived after we discontinued medicine immunosuppression therapy, without side effects and signs of rejection. In this experiment, we will make use of the techniques of flow cytometry to explore the donor cell microchimerism within the peripheral blood of recipient after osteomyocutaneous allotransplantation. Fifteen Lewis rats (RT-1^l) were divided into three groups and received osteomyocutaneous grafts from the crus of Brown Norway rats (RT-1ⁿ). Group I were administered with 0.5 mg/kg/day FK506 and 10 mg/kg/day Leflunomide (LEF) from 1 day before transplantation to day 30 after transplantation. Group II received single DST 7 days before transplantation with the same immunosuppressive protocol. In group III the dosage of FK506 was raised

into 1 mg/kg/day with the same time course and dosage of LEF. After transplantation, whole blood was collected from the tail of the recipients and donor originated cells were detected by flowcytometry. The lymphocytes of recipient blood was also stained with monoclonal anti-CD4 and CD8 antibodies, and counterstained with anti-CD45RC antibodies for dual fluorescence analysis by flowcytometry. The mean survival time of the three groups were (63.17 ± 23.86), (41.6 ± 0.9), and (73 ± 13.08) days respectively. The cell chimerism of Group II was significantly lower than that of Group I and III. This results indicated that donor specific transfusion 7 days before transplantation is unfavorable to the graft survival and cell chimerism on rat osteomyocutaneous transplantation. The ratio of CD4+ and CD8+ cell in peripheral blood was not significant change after transplantation, but the ratio of donor original CD4+ lymphocyte was gradually raise. It may be relative to the rejection of allograft. The CD45RC⁻ / CD45RC⁺ ratio of CD4⁺ and CD8⁺ cells was not significantly changed before discontinuity of immunosuppression but it rose significantly after the cease of immunosuppression. It hinted that acute rejectin after osteomyocutaneous allotransplantation was inhibited succesfully by our immunosuppression programe.

Keyword : Osteomyocutaneous Allotransplantation, Immunosuppressant, Flow cytometry, CD4, CD8, CD45RC, and Microchimerism

二、緣由與目的

長久以來，肢體缺損的患者僅能藉由兩種方式來改善肢體的缺憾：裝置義肢 (Prosthesis)與進行重建手術 (Reconstruction)；但義肢的功能有限，與正常組織的功能相距甚遠；而重建手術除了會對捐贈區組織造成損傷外，尚受限於組織區域的大小，且移植後外表的美觀與否仍是個值得考慮的問題；因此發展一種

更妥善的治療方法是迫切需要的，而異體組織移植應是一個適當的發展方向。

以往肢體移植的研究多以犬、兔及狒狒等做為實驗動物^(11,18,34)，近年來因顯微手術成熟，再加上多種系內品種(Inbred)大鼠的組織相容性抗原(MHC)多已被標定出來^(3,10)，故目前的研究多改以大鼠作為實驗動物之模式；而不同品系之MHC抗原存在不同程度之差異，可作為研究異體移植之排斥反應與移植物抗宿主病(Graft vs Host Disease, GVHD)的參考，目前較常被使用做移植研究之高不相容性大鼠組合有ACI to WF, WF to LEW, ACI to LEW,及BN to LEW。

使用免疫抑制劑是目前治療排斥最方便的方法；早期常使用的抗排斥藥如Azathioprine是一種抗代謝藥物，可干擾RNA的合成與功能；還有一些特殊的抗生素如mitomycin C與actinomycin等均曾被用來治療排斥，但效果都不顯著，直至1980年代環孢靈(cyclosporine, CsA)被發展出來，並成功地運用在腎臟、肝臟、小腸及皮膚等器官或組織的移植上，使移植物能長期存活^(22,33,36)，才使治療排斥的方法有較大的進展，但單獨使用於肢體移植的抗排斥作用仍無法令人滿意^(7,9,17)。

FK506是由黴菌*Streptomyces tsukubaensis*所分離出之macrolide antibiotic，其作用機制與CsA相似，但效果是CsA的10-100倍，而毒性卻明顯較小；曾有報告指出其對大鼠之小腸異體移植特別有效，在骨髓移植時亦能有效治療GVHD，在心臟移植也有不錯的抗排斥效果⁽³⁷⁾，甚至在腎臟與胰臟同時移植的病患，無法有效以CsA控制排斥反應時，可以FK506來逆轉初期的排斥反應⁽¹³⁾；而在肢體的異體移植上，以ACI to LEW大鼠的研究模式中，長期的間段投予FK506 (2mg/kg)能成功的使移植物存活近300天，沒有出現排斥反應，甚至能逆轉早期之排斥反應^(4,5,24)。另在94年及95年的報告指出，FK506可增加體內神經生長因子的分泌，而神經在受到擠壓的傷害時投予

FK506,可加速受損的神經恢復功能⁽²⁰⁾(國科會計劃87-2314-B-002-032)。

Leflunomide(LEF)是最近新發展出的免疫抑制劑,在大鼠的動物模式中,能有效的抑制或逆轉腎臟、心臟、小腸甚至皮膚的異體排斥作用以及GVHD^(14,19),而在hamster到大鼠的異種心臟移植中,他亦能延長心臟的存活;在DA×LEW的心臟移植模式中,LEF(10mg/kg)的抗排斥效果被評估與CsA(15mg/kg) FK506(1mg/kg)相同⁽³⁷⁾。

在我們所從事的相關研究中^(41,42,44),已成功地利用免疫抑制劑(併用Cyclosporine及Leflunomide)在老鼠的複合組織⁽⁴³⁾及後肢移植研究⁽⁴²⁾,也得到滿意的功能性恢復,但可惜的是在停止投予免疫抑制劑後,接受移植的老鼠均相繼發生移植物抗宿主病(Graft vs Host Disease)或排斥(Rejection),使移植的肢體無法順利存活下來,因此目前應首要解決的仍是排斥的問題。在我們先前的計劃中,以自行發展的帶骨骼、肌肉、皮膚及血管(Osteomyocutaneous)的組織移植模式,取代原有的肢體移植模式,併用免疫抑制劑LEF及FK506,在投藥30天及停藥後般100天內均未發生任何排斥現象及GVHD,我們擬以此一移植模式作為基礎,來瞭解複合組織移植後細胞交移的情形。

衡量細胞交移的方式很多,以往有人利用對淋巴細胞Y染色體染色的方式^(28,21),也有人利用需要補體的細胞毒殺分析作用(Complement dependent cytotoxicity assay, CDCA)來作細胞交移的研究^(23,15),但最常被使用的是流式細胞分析儀(Flow cytometry, FCM)的分析^(16,35,30,8,26,29,32)。近年來因為分子生物學的進步,已有人利用聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR)來偵測人肝臟、心臟、肺臟及腎臟^(30,27,40)移植後細胞交移的情形;另外也有運用螢光原位雜交(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)⁽¹⁾技術在細胞交移的偵測上;而為了提高偵測細胞交移的敏感度,更有人合併FCM與PCR的技術來監

測伴隨有骨髓輸入的單一器官或多重器官移植病人^(31,12),或是合併FCM與FISH方式監測骨髓移植病人⁽¹⁾體內的細胞交移情形。在動物實驗上,以FCM偵測細胞交移的情形仍是最普遍的^(26,2),另有人以PCR的技術來監控大鼠肝臟移植模式中^(38,28,2)細胞交移的情形,近年來也有人在狗異種性別的骨髓移植(公狗移給母狗)後,以PCR/RFLP的方法偵測到接受者的血液、骨髓及脾臟等組織中有接受者的細胞⁽⁶⁾。

而用來作為偵測細胞交移的對象也有幾種,最常見的是在性別不同的移植配對中,偵測細胞中Y Chromosome的存在^(28,21,38,27),而在經HLA typing的骨髓或器官移植患者,也可以藉由已有的Mouse anti-HLA type specific Mab,來偵測細胞交移的結果^(30,29,32);而最近在分子生物學的支持下,針對不同HLA phenotype的基因或Y Chromosome所設計的引子(Primer)也被應用來偵測腎臟移植病人^(31,12)的細胞交移情形。在動物實驗上,最常被使用的偵測對象仍以Y Chromosome較多^(38,39);另外在純品系大鼠的配對移植實驗中(如ACI鼠移植給LEW鼠),以單株抗體偵測其MHC分子RT1 Phenotype(ACI為RT1^a,LEW為RT1¹)也是常被使用的方式⁽²⁶⁾。

在這些針對細胞交移的研究中,也報告了一些細胞交移的種類、時間及頻率的相資料;1995年對同時有骨髓與心臟(或肺臟)移植的病人追蹤研究指出,在15個伴隨有骨髓移植的臟器移植病人中,有11個人周邊血液在移植後220天(最後一次追蹤)仍能偵測到提供者的白血球;而未伴隨骨髓移植的臟器移植,則僅有一個病人(1/5)移植15天曾被檢測到提供者的白血球,其餘均無法偵測到⁽³⁰⁾。1997年對伴隨有骨髓移植的大鼠腎臟移植實驗中發現,提供者的CD8+細胞在移植後會短暫出現接受者週邊血液中,而提供者的CD16+細胞則無法在移植後被偵測到⁽²⁶⁾,而該項實驗模式的移植物長期存活率(存活120天以上)僅有50%。1998年另

一組針對大鼠心臟異位移植（伴隨有心臟移植）的研究中指出，在移植後 56 天仍可在接受者週邊血液中偵測到提供者的細胞，但超過 100 天後就測不到了；而當老鼠犧牲後，可分別在接受者的心臟(95%)、皮膚(80%)及脾臟(23%)偵測到提供者的基因物質(DNA)存在，而且伴隨有骨髓移植的大鼠偵測到的比率越高⁽³⁹⁾。

雖然許多研究中均提到產生細胞交移不一定能使接受者對移植植物產生免疫耐受性，而產生免疫耐受性的接受者體內，也不一定會有細胞交移的情形^(25,23,8,27)，但瞭解移植後細胞交移的情形及其交移相關位置仍有助於我們來探索深奧而難懂的移植免疫學，尤其在組成複雜的複合組織或肢體移植中，瞭解其細胞交移的情形應該能夠改善移植植物長期存活的成功率；因此本研究擬應用本研究室所發展出來的帶骨骼、肌肉、皮膚及血管(Osteomyocutaneous)的組織移植模式，來研究移植後提供者細胞出現在接受者週邊血液的頻率、時間與細胞種類。

三、實驗方法

雄性成年之 Lewis(LEW, RT1^l)大鼠，體重為 250-350 公克，作為帶骨骼、肌肉及皮膚瓣(OMC)接受者。雄性成年之 Brown Norway(BN, RT1ⁿ)大鼠，體重為 250-300 公克，作為 OMC 的捐贈者。

第一組(n=5)

進行 BN 至 LEW 的 OMC 移植，並於移植前一天開始口服投予 LEF 10 mg/kg 及皮下注射 FK506 0.5 mg/kg 免疫抑制劑，直至移植後 30 天為止。

第二組(n=5)

在進行 BN 至 LEW 的 OMC 移植前 7 天，由 LEW 尾靜脈打入 1ml heparin 抗凝的 BN 鮮血，即進行 donor specific transfusion，並由移植前一天開始口服投予 LEF 10 mg/kg 及皮下注射 FK506 0.5 mg/kg 免疫抑制劑，直至移植後 30 天為止。

第三組(n=5)

進行 BN 至 LEW 的 OMC 移植，並於移植前一天開始口服投予 LEF 10 mg/kg 及皮下

注射 FK506 1 mg/kg 免疫抑制劑，直至移植後 30 天為止。

術後觀察與評估

每日觀察記錄接受者的健康狀況、體重及移植植物的存活情形。

1.接受者觀察方面：觀察接受者食慾、進食狀況、排泄物、秤量體重、外觀、皮毛狀況，以進一步評估有無 GVHD、感染、吸入性肺炎等症狀。若出現衰弱、弓背、食慾降低、體重減輕、紅色鼻分泌物等症狀，則將大鼠先以 Isoflurane 誘導麻醉後，自尾靜脈抽取週邊血液監測細胞交移情形，再以心內注射致死劑量之 Sodium pentobarbital 以安樂死，並進行病理學檢查及組織採樣等。

2.移植植物觀察方面

可分為術後觀察、排斥及停藥後免疫耐受性的觀察

a.手術成功與否的判定：移植後48小時內皮膚壞死，表示血管吻合手術失敗，不計入實驗組中。

b.排斥的觀察：以觀察所移植組織的皮膚為準，若皮膚出現紅腫、皮屑或掉毛現象，視為排斥的起始；若皮膚發生潰爛或壞死時，則視為排斥的終點。

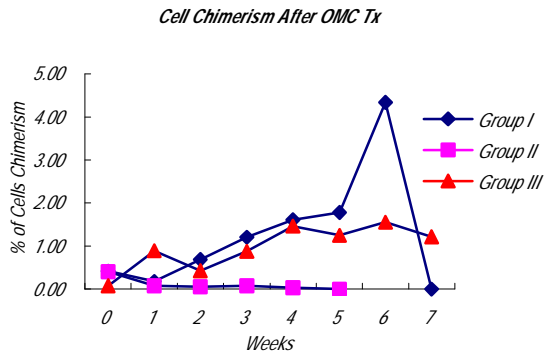
c.停藥後免疫耐受性(Immune Tolerance)的觀察：停止投予免疫抑制劑後 90 天（即移植後 120 天），如無發生排斥現象，則判定接受者對該移植植物產生耐受性，並將該鼠犧牲、採樣，以便作分析。

週邊血液細胞交移的分析

自 OMC 移植後，每週由接受者尾靜脈抽取血液，以 heparin 抗凝，經溶血及離心後，取 5×10^5 個白血球細胞進行免疫螢光染色；染色過程中，以 OX-27 (anti-RT1A^c) 進行間接染色，並在 R-PE 呈色後，另以 OX 35-FITC(antiCD4a) 或 OX 8-FITC(antiCD8a)染色後，以流式細胞分析儀分析細胞交移的情形。

移植後 CD4+及 CD8+細胞表現 CD45RC 分子的比率

自 OMC 移植後，每週由接受者尾靜脈抽取血液，以 heparin 抗凝，經溶血及離心後，取 5×10^5 個白血球細胞進行免疫螢光染



色；染色過程中，將 OX 35-FITC 或 OX 8-FITC 同時與 OX 22-PE (anti CD45RC) 放入細胞溶液中作用後，以流式細胞分析儀分析 CD4+ 及 CD8+ 細胞表現 CD45RC 分子的情形。

四、結果

移植後觀察結果：

各組移植植物皆在術後 24-48 小時出現輕重不等的紅腫症狀，該症狀在 4-6 天後即消退，各組間無顯著差異；移植後各組接受者體重均下降，並在第 10 至 13 天開始回升；所有移植植物皆在停藥後才出現排斥，且各組移植植物皆無法達到預定的產生免疫耐受性的標準（移植後 120 天未發生排斥）。

移植植物排斥時間：

移植後，各組移植植物開始排斥的時間如表一；第一與第二組之間有顯著差異 ($P < 0.05$)，第二組與第三組之間有極顯著差異 ($P < 0.01$)，第一組及第三組之間無顯著差異 ($P > 0.05$)；第二組排斥終點時間在開始排斥後 2 至 4 天，但第一與第三組則在 5 至 7 天組又。

表一 各組移植植物發生排斥的平均時間

組別	處理方式	發生排斥起始天數	平均日
I	FK0.5/	66, 48, 110,	63.17 ±
	LEF 10	51, 49, 55	
II	FK0.5/	40, 42, 42, 42,	41.60 ±
	LEF 10/	42, 42	
	DST		
III	FK1.0/	91, 61, 84, 62,	73.00 ±
	LEF 10	62, 78	

細胞交移結果

各組移植後，每週抽血經 OX 27 抗體染色，並以流式細胞分析儀分析結果如圖一；

圖一 移植後週邊血液細胞交移情形

第一組及第三組均在移植後一週即可在週邊血液測到細胞交移現象，之後細胞交移情形逐漸增加，及致發生排斥前，細胞交移的情形才逐漸減少，而在發生排斥後，即無法測到細胞交移情形；第二組在經過輸血後有產生輕微細胞交移的情形，但在 OMC 移植後細胞交移的情形降低，到發生排斥前，都移植維持在很低的狀態下。

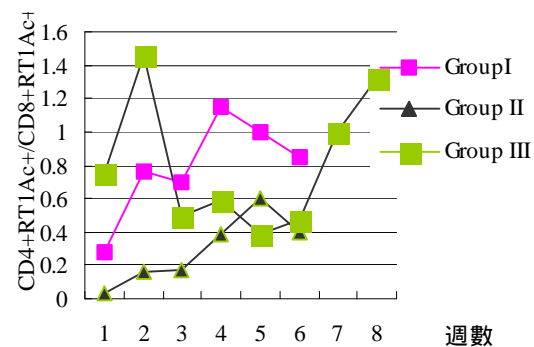
移植後週邊血液 CD4+ 細胞與 CD8+ 細胞的變化

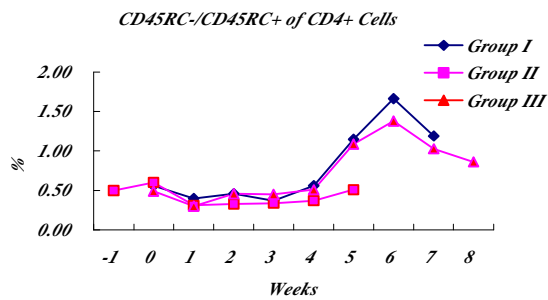
移植後，三組的週邊血液 CD4+ 及 CD8+ 細胞的比率並無太大差異，亦無上升或下降的趨勢，但是 donor 來源的 CD4+ 及 CD8+ 細胞則有較顯著的差異；圖二為接受者週邊血液中 donor 來源淋巴球的 CD4 分子與 CD8 分子的比率，移植後三組的 donor CD8+ 細胞均較 CD4+ 細胞為多，但在接近排斥時，CD4+ 的細胞則漸漸升高。

圖二 移植後 donor 來源淋巴細胞表現 CD4 與 CD8 的比值

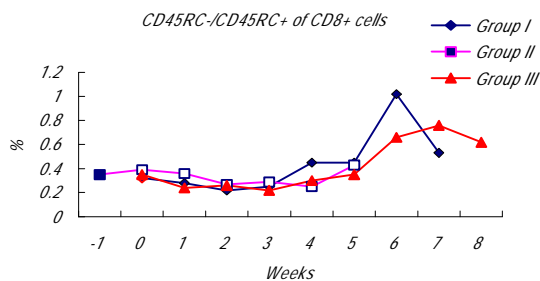
移植後週邊血液中 CD4+ 細胞或 CD8+ 細胞表現 CD45RC 分子的情形

移植後三組接受者大鼠，其週邊血液 CD4+ 細胞或 CD8+ 細胞表現 CD45RC 分子的情形分別為圖三及圖四。





圖三 移植後 CD4+細胞中呈現 CD45RC-與 CD45RC+的比值



圖四 移植後 CD8+細胞中呈現 CD45RC-與 CD45RC+的比值

五、討論

由移植發生排斥的時間來看，經 DST 處理組發生排斥的時間最早，這與許多器官移植的論文結果很不相同；在許多肝臟、腎臟及心臟的移植論文中發現，移植前進行 donor 來源的輸血，有助於延長移植物的存活時間，甚至能引發免疫耐受性，但本實驗的結果卻與其相反，經輸血的移植物 (group II) 排斥時間較未輸血組 (group II & III) 早；可能是因為本實驗採用抗原性較複雜的複合組織移植，因此使 DST 的效果無法如一般器官移植顯現出來，或者需要更多次的輸血以及更長的潛伏期，才能使 DST 的效果顯現出來。因為 DST 原本即存在有 presensitize 的危險，因此本實驗的 DST 在無法引發特定的免疫抑制效果後，反而造成接受者被 donor 抗原致敏化，因此在停藥後更容易被排斥。

就免疫抑制劑的使用而言，在 FK506 與 LEF 的搭配下，投藥期間均未發生排斥反應，也無 GVHD，接受者的體重也在移植後 10 天起逐漸回升，表示此種組合能有效控制複合組織移植的排斥反應，而且不會對接受者造成傷害，相信這種組合能供未

來複合組織移植的免疫計畫使用；至於 FK506 的劑量由 0.5mg/kg/day 增加至 1mg/kg/day 後，移植物的存活時間雖有增加，但並無顯著差異，似乎增加劑量並不能明顯延長移植物的存活時間，如何在劑量與存活時間作一取捨，則需要再作進一步研究。

在週邊血液細胞交移監測上發現，OMC 移植 (又稱為帶血管骨髓移植) 移植後，週邊血液中最高僅能找到不足 5% 的 donor 來源細胞，多數比率低於 2%，這與一般骨髓移植結果也不同；這可能是本實驗中未做 recipient 的骨髓闕除術 (如 Total body irradiation)，recipient 的免疫系統能有效壓抑 donor 細胞的擴散，而且停藥後還是將 donor 細胞清除了。另外，經 DST 處理組週邊血液中，一直僅存在極低量 (幾乎都低於 0.5%) 的 donor 細胞，這可能是因為 DST 導致該組接受者被致敏化，使 donor 細胞很快被 recipient 免疫系統清除掉。

移植後，三組的週邊血液 CD4+ 及 CD8+ 細胞的比率並無太大差異，亦無上升或下降的趨勢，但是 donor 來源的 CD4+ 及 CD8+ 細胞則有較顯著的差異；就資料而言，移植後 donor 來源的 CD8+ 細胞大多較 CD4+ 細胞多，但是越往後期，CD4+ 細胞的比值卻逐漸爬升，因此我們懷疑 CD4+ 細胞比率的爬升或許與排斥有關。

在 CD45RC 分子表現方面，因淋巴球被活化後會失去表現該分子，因此許多論文以 CD45RC-/CD45RC+ 的比值來作為評估免疫抑制的效果；就本實驗的圖三及圖四結果來看，在給予免疫抑制劑時 (前四週)，該比值處於低值，表示免疫抑制劑達到了免疫抑制的效果；但在停藥後，該比值即攀升，並陸續出現排斥現象，顯示 recipient 的免疫系統已由抑制劑中甦醒，並排斥外來移植。這裡面較特殊的是，group II 在停藥後，該比值仍處於即低的數值，但移植物仍然被排斥了，這可能是因為經 DST 處理後，確實產生了免疫抑制的效果，只是這項效果是抑制了抑制性 T 細胞 (T suppressor cells) 的增生，因而使移植物容易被排斥。

六、計畫成果自評

本計畫已使博士班學生廖泰慶（獸醫學研究所）熟悉顯微手術以及流式細胞技術儀的操作；因複合組織的移植較其他器官移植困難，因此許多免疫抑制的計畫都無法成功控制其排斥反應，本實驗成功的配對使用 FK506 及 LEF 來控制其排斥反應，不會對接受者產生副作用；次外本實驗也發現，移植前 7 天單次的 DST 對複合組織的移植沒有好處，反而有害。本研究計畫正在以博士論文的方式書寫(廖泰慶，台大獸醫學研究所)，並在投稿過程中。

七、參考文獻

1. Arkesteijn GJA, Erpelinck SLA, Martens ACM, Hagenbeek A. Chromosome specific DNA hybridization in suspension for flow cytometric detection of chimerism in bone marrow transplantation and leukemia. *Cytometry* 1995;19:353.
2. Blom D, et al. Tolerance induction by intrathymic inoculation prevents chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1998;65(2):272.
3. Butcher, GW. A list of monoclonal antibodies specific for alloantigens of the rat. *Journal of Immunogenetics* 1988;14(2-3):163
4. Buttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U. Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plastic & Reconstructive Surgery* 1996; 97:139.
5. Fealy MJ, Umansky WS, Bickel K, Nino JJ, Morris RE, Ress BH. Efficacy of rapamycin and FK506 in prolonging rat hind limb allograft survival. *Ann Surg Transplant Proc*1994; 219:88.
6. Ferrara ML, Teutsch SM, Hawthorne WJ, Tucker VE, Stewart GJ, Anson DS. Determination of cell origin after marrow transplantation in canines by polymerase chain reaction and quantitation of the ZFY/ZFX genes. *Transplantation* 1998;65:1100
7. Fritz W, Swartz WM, Rose S, Futrell JW, Klein E. Limb allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. *Ann Surg* 1984;199:211.
8. Fukuzaki T, Hancock WW, Monaco AP, Maki T. Indefinite survival of skin allografts in adult thymectomized, antilymphocyte serum-treated mice given bone marrow and thymus grafts of donor origin: tolerance induction by donor bone marrow and thymus. *Transplantation* 1998;65(8):1036.
9. Furnas DW, Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, Achauer BM. Cyclosporine and long-term survival of composite tissue allografts (limb transplants) in rats. 1983; 15:3063.
10. Gill III TJ, Kunz HW, Misra DN, Hassett ALC. The major histocompatibility complex of the rat. *Transplantation* 1987;43(6):773
11. Goldwyn RM, Beach PM, Feldman D, et al. Canine limb homotransplantation. *Plast. Reconstr Surg* 1966; 47:184.
12. Garcia-Morales R, et al. PCR-flow analysis used to detect the levels of chimerism in peripheral blood of bone-marrow infused organ allograft recipients at the time of rejection episodes. *Transplantation Proceedings* 1997;29:2179.
13. Hariharan S, Hunda R, Cavallo T, Demmy AM, Schroeder TJ, Alexander JW, First MR. Rescur therapy with tacrolimus after combined kidney/pancreas and isolated pancreas transplantation in patients with severe cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1996;61:1161.
14. He G, McAlister VC, Lee TDG et al. Oral lefunomide prevents small bowel allograft rejection in the rat. *Transplant Proc.* 1994; 26:1613.
15. Henson LE, Hewitt CW, Black KS. Use of regression analysis and the complement dependent cytotoxicity assay for predicting lymphoid chimerism. *Journal of Immunological Methods* 1988;114:139.
16. Ildstad ST, Bluestone JA and Sachs DH. Alloresistance to engraftment of allogeneic donor bone marrow is mediated by an Lyt-2+ T cell in mixed allogeneic reconstitution. *Journal of Experimental Medicine* 1986;163:1343.
17. Kim SK, Aziz S, Oyer P, Hentz VR. Use of cyclosporin A in allotransplantation of rat limbs. *Ann Plast surg* 1984; 12:249.

18. Kniha H, Randzio J, Gold ME, et al. Growth of forelimb allografts in young rabbits immunosuppressed with cyclosporine. *Ann Plast Surg* 1989; 22:135
19. Kuchle CCA, Thoenes GH, Langer KH, Schorlemmer HU, Bartlett RR, Schleyerbach R. Prevention of kidney and skin graft rejection in rats by leflunomide, a new immunomodulation agent. *Transplant Proc* 1991; 23:1083.
20. Kuroki H, Ikuta Y. Nerve regeneration of vascularized rat limb allograft and functional recovery of long-term graft survivals treated by short course of FK506 or Cyclosporine. *Transplant Pro* 1995 ; 27:348
21. Korver K De Lange GG, Van den Bergh RL, Schellekens PT, Van Loghem E, Van Leeuwen F and Vossen JM. Lymphoid chimerism after allogeneic bone marrow transplantatin. Y-chromatin staining of peripheral T and B lymphocytes and allotyping of serum immunoglobulins. *Transplantation* 1987; 44:643.
22. Lee KKW, Schraut WH. Structure and function of orthotopic small Bowel allografts in rats treated with cyclosporine. *Am J Surg* 1986; 151:55
23. Leenaerts PL, Vandeputte M, Waer M. Determination of mixed chimerism by a simple flow cytometry method. *Journal of Immunological Methods* 1990;130:163.
24. Min Z, Jones NF. Limb transplantation in rats: immunosuppression with FK-506. *Journal of Hand Surgery-American Volume* 1995; 20:77.
25. Murase N, Starzl TE, Tanabe M, Fujisaki S, Miyazawa H, Ye Q, Delaney CP, Fung JJ, Demetris AJ. Variable chimerism, Graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from lewis to brown norway rats. *Transplantation* 1995; 60:158.
26. Naar JD, et al. Flow cytometric analysis of chimerism in the rat tolerant to a renal allograft. *Journal of Surgical Research* 1998; 77:179.
27. Okasha KM, Al-Tweigeri TA, Jurado AV, Shoker AS. Analysis of the relationship between chimerism and the allogeneic humoral response. *Transplantation* 1998;66(8):1028.
28. O'Reilly RJ, Patterson JH, Bach ML, Hong R, Kissmeyer-Nielsen F, Therkelsen AJ. Chimerism detecting by HLA typing. *Transplantation* 1973;15:505
29. Pei R, Chen T, Orpilla J, Lee JH. A simultaneous negative and positive selection method that can detect chimerism at a frequency of 1 per 10,000 by flow cytometry. *Tissue Antigens* 1997;50:197.
30. Pham SM et al. Perioperative donor bone marrow infusion augments chimerism in heart and lung transplant recipients. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1015.
31. Rolando GM, et al. The effects of chimeric cells following donor bone marrow infusions as detected by PCR-flow assays in kidney transplant recipients. *The Journal of Clinical Investigation* 1997;99(5):1118.
32. Schlitt HJ, et al. Persistence of donor lymphocytes in liver allograft recipients. *Transplantation* 1993;56(4):1001.
33. Sobrado L, Pollak R, Robichaux WH, Martin PC, Sullivan KA, Swartz WM. The survival and nature of the immune response to soft-tissue and composite-tissue allografts in rats treated with low-dose cyclosporine. *Transplantation* 1990;50:381
34. Stark GB, Swartz WM, Narayanan K, Moller AR. Hand transplantation in baboons. *Transplant Proc* 1987;19:3968.
35. Sykes M, Sachs DH. Mixed allogeneic chimerism as a approach to transplantation tolerance. *Immunology Today* 1988;9:23.
36. Tan CM, Yaremchuk MJ, Randolph MA, Lee WPA, Burdick J, Weiland AJ. Vascularized muscle allografts and the role of cyclosporine. *Plast Reconstr Surg* 1991;87:412
37. Tanabe M, Todo S, Murase N, Irish W, Miyazawa H, Fujisaki S, Starzl TE. Combined immunosuppressive therapy with low dose FK506 and antimetabolites in rat allogeneic heart transplantation. *Transplantation* 1994;58:23
38. Tashiro H, et al. Monitoring for engraftment following rat orthotopic liver transplantation by

- the polymerase chain reaction.
Transplantation Proceedings 1994;26(2):902.
39. Terakura M, Murase N, Demetris AJ, YeQ, Thomson AW, Starzl TE. Lymphoid/nonlymphoid compartmentalization of donor leukocyte chimerism in rat recipients of heart allografts, with or without adjunct bone marrow. Transplantation 1998;66(3): 350.
 40. Ueda M, et al. Development of microchimerism in pediatric patients after living-related liver transplantation. Clin Transpl 1997;11:193
 41. Yeh LS, Hou SM, Lin AC. Vascularized autogenous canine coccygeal bone transfer. Microsurg. 1991;12:321.
 42. Yeh LS. Gregory CR. Griffey SM. Lecouter RA. Hou SM. Morris RE. Combination leflunomide and cyclosporine prevents rejection of functional whole limb allografts in the rat. Transplantation. 1997 ; 64(6):919-22.
 43. Yeh LS. Gregory CR. Griffey SM. Lecouter RA. Hou SM. Morris RE. Synergic effect of leflunomide and cyclosporine in rat myocutaneous allotransplantation. Transplantation 1996;62(60):861.
 44. Yeh LS, Hou SM, Lin AC, Lin J. A modified free gracilis flap in the rat. Microsurg. 1994;15:322.